

Zmiany biochemiczne w napromieniowanych koncentratkach krwinek czerwonych przechowywanych do 42 dni

Biochemical changes in irradiated Red Blood Cells stored up to 42 days

Jolanta Kubis¹, Elżbieta Lachert¹, Jolanta Antoniewicz-Papis²,
Aleksandra Dzieciatkowska¹, Magdalena Łętowska²

Instytut Hematologii i Transfuzjologii

¹Zakład Zapewnienia Jakości i Organizacji Służby Krwi

²Zakład Diagnostyki Hematologicznej i Transfuzjologicznej

Streszczenie

Wstęp: Jedynym skutecznym zabezpieczeniem chorych przed rozwinięciem ciężkiego powikłania, jakim jest poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciwko biorcy (TA-GvHD), jest przetaczanie krwi i składników krwi uprzednio poddawanych działaniu promieniowania jonizującego gamma (γ). Napromieniowaną krew i składniki krwi należy stosować przede wszystkim: u pacjentów z wrodzonymi lub nabytymi zaburzeniami odporności, przy transfuzjach dopłodowych i transfuzjach wymiennych u noworodków oraz w przypadkach bliskiego pokrewieństwa dawcy i biorcy.

Napromieniowanie krwi i jej składników powoduje inaktywację limfocytów T, bardziej wrażliwych na promieniowanie niż inne komórki terapeutycznie aktywne, jak krwinki czerwone, krwinki płytkowe i granulocyty. Nie ustalono dotychczas optymalnej dawki promieniowania gamma dla koncentratów krwinek płytkowych (KKP) ani dla koncentratów krwinek czerwonych (KKCz).

Celem pracy jest ocena wpływu dwóch różnych dawek promieniowania gamma (25 Gy i 50 Gy) na przechowywane KKCz oraz ocena zmian zachodzących w napromieniowanych KKCz w zależności od czasu ich przechowywania (42 dni, temperatura 4°C) w roztworze wzbogacającym ADSOL.

Materiał i metody: Do badań przeznaczono 45 jednostek KKCz z roztworem wzbogacającym ADSOL. Dla oceny jakości KKCz in vitro badano: liczbę krwinek czerwonych (RBC), liczbę krwinek białych (WBC), stężenie hemoglobiny (Hb), stężenie jonów potasu (K^+) i sodu (Na^+), stężenie adenozynotrifosforanu (ATP) i 2,3-difosfoglicerynianu (2,3-DPG), hematokryt (Ht) oraz pH.

Wyniki: Znamienne statystycznie wzrost stężenia K^+ stwierdzono w KKCz napromieniowanych dawką 50 Gy we wszystkich dniach przechowywania. Stężenie 2,3-DPG utrzymywało się na stałym poziomie (0,7–0,1 μ mol/ml) w grupie KKCz napromieniowanych dawką 25 Gy oraz w grupie KKCz kontrolnych, natomiast w KKCz napromieniowanych dawką 50 Gy, stężenie 2,3-DPG wynosiło zaledwie 0,04 μ mol/ml.

Adres do korespondencji: mgr Jolanta Kubis, Zakład Zapewnienia Jakości i Organizacji Służby Krwi, ul. Indiry Gandhi 14,

Wnioski: Z porównania podstawowych parametrów biochemicznych (stężenie ATP i 2,3-DPG, stężenie Hb, stężenie jonów K^+) w grupie napromieniowanych (25 i 50 Gy) KKCz oraz składników krwi niepoddanych działaniu promieniowania gamma wynika, że KKCz napromieniowane dawką 50 Gy należy przechowywać w temperaturze 4°C nie dłużej niż 14 dni, niezależnie od stosowania roztworu wzbogacającego. Koncentraty krwinek czerwonych napromieniowane dawką 25 Gy można przechowywać do 28 dni przed przetoczeniem. Z przeprowadzonych in vitro badań wynika, że napromieniowane krwinki czerwone spełniają swoje funkcje w organizmie biorcy.

Słowa kluczowe: koncentrat krwinek czerwonych (KKCz), poprzetoczeniowa choroba przeszczep przeciwko biorcy (TA-GvHD), napromieniowanie

J. Transf. Med. 2008; 1: 46–54

Summary

Introduction: Irradiation of whole blood and cellular components is currently the only effective method of preventing the severe complication of transfusion-associated graft-versus-host disease (TA-GvHD). The main indication for irradiated blood and blood components is for patients with congenital or acquired immunological deficiency, in cases of neonatal intrauterine and exchange transfusions as well as in close relationship between donor and recipient.

Irradiation of blood and blood components results in the inactivation of T lymphocytes, more sensitive to irradiation than other therapeutically active cells such as erythrocytes, platelet concentrates and granulocytes. No optimal dose of gamma irradiation for Red Blood Cell Concentrates (RBCs) and Platelet Concentrates (PCs) has yet been determined.

The aim of this study was to determine the effect of two different irradiation doses (25 Gy, 50 Gy) on the in vitro functions of RBCs as well as changes in irradiated RBCs stored in ADSOL for various periods of time (7, 14, 28, 35, 42 days of storage at 4°C).

Material and methods: The study involved 45 units of RBCs in ADSOL. The following tests were performed to assess the quality of in vitro functions of RBCs: erythrocyte (RBC) and leukocyte (WBC) counts, hematocrit (Ht), supernatant hemoglobin (Hb), potassium (K^+) and sodium concentration (Na^+), adenosine-tri-phosphate concentration (ATP), 2,3-diphosphoglycerate (2,3-DPG) and pH.

Results: The statistically significant increase of K^+ was determined in irradiated PCs (50 Gy) on all storage days. The same level of 2,3-DPG concentration was found in control group and RBCs irradiated with 25 Gy, while the 2,3-DPG concentration in groups irradiated with 50 Gy was only 0,04 $\mu\text{mol/ml}$.

Conclusion: Comparison of the basic biochemical parameters (APT level, 2,3-DPG, Hb, K^+ concentration) of the 25 and 50 Gy irradiated RBCs with those of the unirradiated RBCs, gives grounds for conclusion that RBCs irradiated with 50 Gy should not be stored at 4°C for more than 14 days, whether in ADSOL or not, while RBCs irradiated with 25 Gy can be stored up to 28 days prior to transfusion. In vitro tests demonstrate that irradiated RBCs function well in the recipient's circulatory system.

Key words: red blood cells (RBCs), transfusion-associated graft-versus-host disease (TA-GvHD), irradiation

J. Transf. Med. 2008; 1: 46–54

Wstęp

Potransfuzyjna choroba przeszczep przeciwko biorcy (TA-GvHD, *transfusion-associated graft-versus-host disease*) należy do bardzo ciężkich powikłań

poprzetoczeniowych. Warunkiem jej wystąpienia jest przetoczenie immunokompetentnych, allogeicznych limfocytów do organizmu biorcy, którego system immunologiczny jest niezdolny do ich zniszczenia. Chociaż powikłanie to zdarza się bardzo

Tabela 1. Zawartość limfocytów w składnikach krwi według *American Association of Blood Banks***Table 1.** Lymphocyte concentration in blood components according to American Association of Blood Banks

Składnik krwi	Limfocyty/ /jednostkę
KP KKCz	$1,0\text{--}2,0 \times 10^9$
KKCz (płukany)	$1,0\text{--}2,0 \times 10^8$
KKCz mrożony, po deglicerolizacji	$5,0 \times 10^7$
KKP 1 jednostka	$4,0 \times 10^7$
KKP z separatora	$3,0 \times 10^8$
Osocze	$1,5 \times 10^5$
Osocze świeżo mrożone	0
Krioprecypitat	0

KP — krew pełna; KKCz — koncentrat krwinek czerwonych; KKP — koncentrat krwinek płytkowych

rzadko (zachorowalność u pacjentów z chorobami rozrostowymi układu krwiotwórczego i chorobami limfoproliferacyjnymi ocenia się na 0,1–1%), to, ze względu na brak skutecznego leczenia i wysoką śmiertelność (80–90%), TA-GvHD stanowi poważny problem w praktyce klinicznej [1, 2].

Nie jest znana dokładna dawka limfocytów, która powoduje wystąpienie TA-GvHD. Opierając się na badaniach przeprowadzonych na zwierzętach, wykazano, że już dawka 10^7 limfocytów dawcy/kg masy ciała biorcy może wywołać chorobę [3–5]. Spośród składników krwi przeznaczonych do użytku klinicznego wystarczającą do wywołania TA-GvHD ilość limfocytów zawierają: krew pełna, koncentrat krwinek czerwonych (KKCz), KKCz przemylanych, koncentrat deglicerolizowanych krwinek czerwonych, koncentrat krwinek płytkowych (KKP) i koncentrat granulocytarny (tab. 1) [6–8]. Leczenie powikłania jest nieskuteczne. Należy podejmować w związku z tym działania profilaktyczne, mające na celu zapobieganie lub zmniejszanie ryzyka jego wystąpienia.

Większość stosowanych obecnie metod usuwania leukocytów pozwala na zmniejszenie ich początkowej zawartości o około 99%. Nawet filtry najnowszej generacji stosowane do usuwania leukocytów, które skutecznie zapobiegają alloimmunizacji i gorączkowym niehemolitycznym odczynom poprzetoczeniowym, pozostawiają około 10^6 leukocytów w składniku krwi, co nie zabezpiecza biorcy przed wystąpieniem TA-GvHD [9, 10].

Jedyny skuteczny sposób zabezpieczający chorych leczonych krwią i jej składnikami przed rozwinieniem ciężkiego powikłania, jakim jest TA-GvHD, to poddanie krwi i jej składników działaniu promie-

niowania jonizującego γ . Zastosowanie tego promieniowania jest możliwe ze względu na duże różnice wrażliwości komórek krwi na jego działanie. Limfocyty i tkanka limfoidalna należą do najbardziej wrażliwych na działanie promieniowania γ [11–13]. W związku z tym istnieje możliwość takiego dobrania dawki promieniowania jonizującego, aby znosiła ona aktywność proliferacyjną limfocytów, nie wpływając szkodliwie na funkcje pozostałych komórek stosowanych w celach terapeutycznych, jak krwinki płytkowe, krwinki czerwone i granulocyty.

Nie ustalono dotychczas optymalnych dawek promieniowania gamma dla poszczególnych składników krwi. Ten sam zakres dawki 20–50 Gy zaleca się zarówno dla KKP, jak i dla KKCz. Najlepszym rozwiązaniem byłoby napromieniowanie jednostek bezpośrednio przed przetoczeniem, jednak ze względów technicznych nie zawsze jest to możliwe.

Celem pracy było zbadanie jakości KKCz napromieniowanych różnymi dawkami promieniowania jonizującego (25 Gy, 50 Gy) przed umieszczeniem w temperaturze 4°C w roztworze wzbogacającym ADSOL oraz sprawdzenie, czy zmiany zachodzące w napromieniowanych składnikach krwi nasilają się wraz z wydłużeniem czasu przechowywania.

Materiał i metody

Do badań przeznaczono 30 KKCz (KKCz/ADSOL-bez kożuszka leukocytarno-płytkowego) otrzymanych metodą manualną, pobieranych do poczwórnych zestawów pojemników (JMS, Japonia). Poszczególne etapy preparatyki wykonywano w układzie zamkniętym przy użyciu zgrzewarki do sterylnej łączenia drenów TSCD (Terumo, Japonia).

Każdą jednostkę krwi pobraną do zestawu z CPD wirowano w temperaturze 4°C w wirówce J-6M/E (Beckman, Niemcy) przez 6 min, 5000 \times g, oddzielono osocze i kożuszek leukocytarno-płytkowy do satelitarnych pojemników (JMS, Japonia), a do pozostałego w macierzystym pojemniku KKCz dodawano 100 ml płynu wzbogacającego ADSOL [14]. Po dokładnym wymieszaniu, KKCz dzielono na 3 równe wagowo części za pomocą zgrzewarki do sterylnej łączenia drenów TSCD. Jeden z 3 pojemników z KKCz umieszczano w lodówce w temperaturze 4°C, a pozostałe 2 pojemniki z KKCz poddawano działaniu promieniowania jonizującego γ w radiatorze Gammacell 3000 Elan (Nordion, Kanada). Zastosowano dawki 25 Gy i 50 Gy. Po napromieniowaniu KKCz przechowywano w tej samej lodówce, w której pozostawiono pojemnik z KKCz niepoddany działaniu promieniowania γ (0 Gy). Temperatura w lodówce była monitorowana, a urządzenie pod-

Tabela 2. Wpływ czasu przechowywania (42 dni) na parametry KKCz w roztworze wzbogacającym ADSOL**Table 2.** Effect of storage time (42 days) on Red Blood Cell Concentrates in ADSOL

Parametry	Dni przechowywania				
	7	14	28	35	42
RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	6,03 \pm 0,25	6,05 \pm 0,26	6,01 \pm 0,24	6,02 \pm 0,25	6,02 \pm 0,25
WBC $\times 10^3$	7,17 \pm 1,07	5,59 \pm 1,10	4,24 \pm 1,21	3,79 \pm 1,24	3,61 \pm 1,37
Ht (%)	55,1 \pm 2,6	57,0 \pm 2,7	57,4 \pm 2,5	57,8 \pm 2,6	57,9 \pm 2,7
Hb [g/l]	0,63 \pm 0,69	1,01 \pm 0,79	1,48 \pm 1,05	2,30 \pm 1,22	2,94 \pm 1,21
pH	7,09 \pm 0,08	6,92 \pm 0,06	6,54 \pm 0,11	6,46 \pm 0,12	6,28 \pm 0,13
Na ⁺ [mmol/l]	147,9 \pm 2,5	141,7 \pm 3,7	139,1 \pm 1,9	140,7 \pm 1,9	136,3 \pm 5,5
K ⁺ [mmol/l]	5,00 \pm 0,31	8,48 \pm 0,78	12,57 \pm 0,98	13,86 \pm 1,07	15,0 \pm 1,15

Tabela 3. Wpływ dawki promieniowania γ (25 Gy) i czasu przechowywania (42 dni) na parametry metaboliczne KKCz w roztworze wzbogacającym ADSOL**Table 3.** Effect of irradiation dose (25 Gy) and storage time (42 days) on Red Blood Cell Concentrates in ADSOL

Parametry	Dni przechowywania				
	7	14	28	35	42
RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	6,03 \pm 0,25	6,05 \pm 0,26	6,01 \pm 0,24	6,02 \pm 0,25	6,02 \pm 0,25
WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$	7,15 \pm 1,10	5,67 \pm 1,07	3,98 \pm 1,67	3,51 \pm 1,64	3,41 \pm 1,71
Ht (%)	54,5 \pm 2,5	56,1 \pm 2,9	57,9 \pm 2,6	58,9 \pm 2,9	59,3 \pm 2,9
Hb [g/l]	0,61 \pm 0,94	1,23 \pm 1,14	1,90 \pm 1,46	3,08 \pm 1,42	4,31 \pm 2,23
pH	7,08 \pm 0,06	6,88 \pm 0,04	6,52 \pm 0,13	6,45 \pm 0,11	6,28 \pm 0,11
Na ⁺ [mmol/l]	145,7 \pm 2,7	138,3 \pm 1,9	134,1 \pm 1,9	136,1 \pm 2,0	132,3 \pm 5,4
K ⁺ [mmol/l]	7,15 \pm 0,62	14,29 \pm 1,70	18,14 \pm 1,21	18,86 \pm 1,46	19,86 \pm 1,57

dawano systematycznej walidacji. W celu wykonania badań pobierano próbki KKCz (ok. 10 ml) ze wszystkich 3 pojemników (0 Gy, 25 Gy, 50 Gy) w 7, 14, 28, 35 i 42 dniu przechowywania.

Przeprowadzono następujące badania:

- 1) oznaczano pH przy użyciu pH-metru Microprocessor HI 9020 (Hanna Instruments, Stany Zjednoczone),
- 2) badano liczbę krwinek czerwonych (RBC), białych (WBC) i hematokryt (Ht) za pomocą analizatora hematologicznego K-4500 (Sysmex, Japonia),
- 3) określano stężenie adenozyntofosforanu (ATP) i 2,3-difosfoglicerynianu (2,3-DPG) przy użyciu zestawów testowych (Sigma, Stany Zjednoczone),
- 4) oznaczano stężenie sodu (Na⁺) i potasu (K⁺) za pomocą analizatora 614 ISE (Ciba Corning, Stany Zjednoczone),
- 5) badano stężenie hemoglobiny (Hb) w supernatancie w aparacie Hemocue (Hemocue, Szwecja). Obliczenia statystyczne przeprowadzano, sto-

suąc program komputerowy EXCEL oraz test *t*-Studenta dla wyników sparowanych.

Wyniki i wnioski

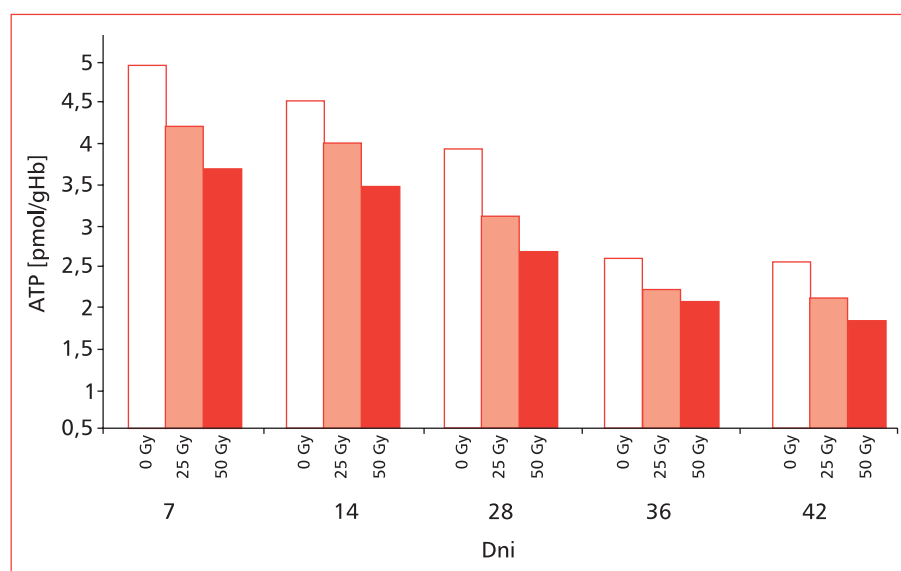
Wyniki z przeprowadzonych badań zebrano w tabelach 2–4 oraz przedstawiono na rycinach 1 i 2.

Jak wynika z danych umieszczonych w tabelach 2–4, liczba RBC w poszczególnych dniach przechowywania wahała się od 6,01 do 6,08 $\times 10^6/\mu\text{l}$ i nie stwierdzono znamienności statystycznej w grupie KKCz niepoddanych działaniu promieniowania (0 Gy) ani w grupach KKCz napromieniowanych dawkami 25 Gy i 50 Gy.

Porównując liczbę WBC w poszczególnych dniach przechowywania, stwierdzono, że zarówno w grupie składników, które nie były poddane napromienowaniu (0 Gy), jak i napromieniowanych (25 Gy i 50 Gy) ich ilość uległa znacznemu obniżeniu (21–22%) już po 14 dniach przechowywania. W 42 dniu przechowywania liczba

Tabela 4. Wpływ dawki promieniowania γ (50 Gy) i czasu przechowywania (42 dni) na parametry metaboliczne KKCz w roztworze wzbogacającym ADSOL**Table 4.** Effect of irradiation dose (50 Gy) and storage time (42 days) on RBCs in ADSOL

Parametry	Dni przechowywania				
	7	14	28	35	42
RBC $\times 10^6/\mu\text{l}$	$6,04 \pm 0,24$	$6,05 \pm 0,31$	$6,07 \pm 0,26$	$6,08 \pm 0,28$	$6,02 \pm 0,29$
WBC $\times 10^3/\mu\text{l}$	$7,14 \pm 0,96$	$5,54 \pm 0,94$	$3,87 \pm 1,51$	$3,43 \pm 1,59$	$3,16 \pm 1,69$
Ht (%)	$54,5 \pm 2,3$	$56,3 \pm 3,1$	$58,7 \pm 2,7$	$60,0 \pm 2,9$	$60,7 \pm 3,1$
Hb [g/l]	$0,61 \pm 0,76$	$1,06 \pm 0,95$	$2,31 \pm 1,36$	$3,94 \pm 2,1$	$5,25 \pm 2,72$
pH	$7,09 \pm 0,05$	$6,88 \pm 0,05$	$6,54 \pm 0,12$	$6,45 \pm 0,09$	$6,25 \pm 0,15$
Na ⁺ [mmol/l]	$143,7 \pm 2,7$	$136,7 \pm 2,8$	$131,8 \pm 2,2$	$134,3 \pm 1,6$	$131,6 \pm 5,5$
K ⁺ [mmol/l]	$9,27 \pm 1,00$	$17,00 \pm 1,10$	$19,70 \pm 1,40$	$20,10 \pm 1,30$	$20,60 \pm 1,50$

**Rycina 1.** Wpływ dawki promieniowania γ i czasu przechowywania na stężenie ATP w KKCz**Figure 1.** Effect of irradiation dose and storage time on ATP concentration in RBCs

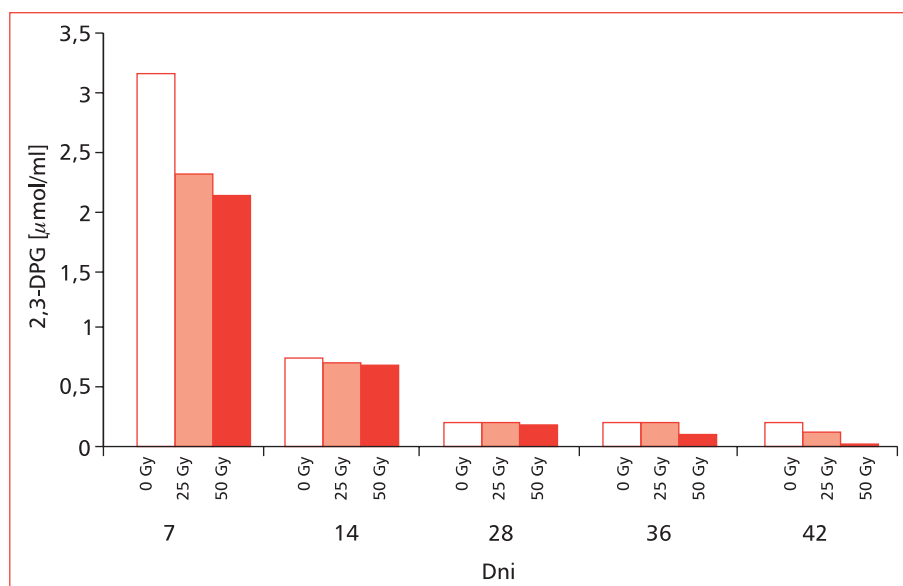
leukocytów stanowiła 50% ich wartości w składnikach, których nie napromieniowano, oraz odpowiednio 48% i 44% w KKCz poddanych działaniu 25 Gy i 50 Gy.

Wartość Ht w badanych grupach KKCz wynosiła 55,1–57,9% dla KKCz, które nie były poddane napromieniowaniu, 54,5–59,3% dla KKCz napromieniowanych dawką 25 Gy oraz 54,5–60,7% przy zastosowaniu dawki 50 Gy.

W trakcie przechowywania KKCz następowało znaczne uwalnianie Hb z krwinki czerwonej do osocza. Jak wynika z danych w tabelach 2–4, jej wartość wzrastała w 3 badanych grupach KKCz. W grupie KKCz, które nie były poddane działaniu promieniowania γ , w 42 dniu przechowywania stę-

żenie Hb (2,94 g/l) ponad 4-krotnie przekroczyło jej wartość z siódmego dnia przechowywania (0,63 g/l). W KKCz napromieniowanych dawką 25 Gy stężenie wolnej Hb zwiększyło się 2-krotnie już w 14 dniu przechowywania i 7-krotnie w końcowym okresie przechowywania (42 dzień) w porównaniu z 7 dniem. Dawka 50 Gy spowodowała prawie 4-krotne zwiększenie stężenia wolnej hemoglobiny już w 28 dniu przechowywania KKCz.

W miarę upływu czasu przechowywania wartość pH nieznacznie się obniżała we wszystkich badanych grupach KKCz. Nie zauważono statystycznie znamiennych różnic w wartościach pH pomiędzy poszczególnymi dniami przechowywania



Rycina 2. Wpływ dawki promieniowania γ i czasu przechowywania na stężenie 2,3-DPG w KKCz

Figure 2. Effect of irradiation dose and storage time on 2,3-DPG concentration in RBCs

dla składników napromieniowanych dwoma dawkami oraz KKCz, które nie były poddane działaniu promieniowania γ .

W czasie przechowywania wszystkich jednostek KKCz stwierdzono znamienne statystycznie wzrost stężenia K^+ . W grupie KKCz niepoddanych działaniu promieniowania γ stężenie to wynosiło 5 mmol/l w 3 dniu przechowywania, a następnie stopniowo wzrastało, osiągając 15 mmol/l w 42 dniu przechowywania. Dla jednostek KKCz napromieniowanych dawką 25 Gy i dawką 50 Gy zawartość K^+ w supernatancie wzrastała dwukrotnie w 14 dniu przechowywania w porównaniu z 7 dniem.

Stężenie Na^+ ulegało nieznacznemu obniżeniu we wszystkich grupach badanych KKCz (od 144–148 mmol/l do 132–136 mmol/l).

Stężenie ATP w przechowywanych jednostkach KKCz obniżało się w miarę upływu czasu przechowywania, zarówno w KKCz, które nie były poddane napromienowaniu, jak i napromieniowanych obiema dawkami. Analiza statystyczna wykazała wystąpienie znamiennych statystycznie różnic pomiędzy wartościami ATP między 7 a 14 dniem oraz 14 a 28 dniem przechowywania. Porównanie składników, które nie były napromieniowane z napromieniowanymi (0:25 Gy, 0:50 Gy), wykazało znamienność statystyczną w 7, 14 i 28 dniu przechowywania. Nie stwierdzono natomiast znamienności statystycznej w badanych grupach KKCz, gdy porównywano dawkę 25 Gy z 50 Gy w poszczególnych dniach przechowywania, z wyjątkiem dnia 7 i 14,

gdzie porównywane wartości okazały się znamienne statystycznie.

W przypadku 2,3-DPG stwierdzono, że największe obniżenie stężenia występowało pomiędzy 7 a 14 dniem przechowywania w obu badanych grupach i w grupie preparatów kontrolnych (0 Gy). Wartości te wynosiły dla KKCz z grupy kontrolnej: 3,15 μ mol/ml w 7 dniu oraz 0,75 μ mol/ml w 14 dniu przechowywania. W składnikach napromieniowanych stężenie 2,3-DPG wynosiło 2,3 μ mol/ml dla dawki 25 Gy oraz 2,15 μ mol/ml dla dawki 50 Gy. Wartości te nie wykazywały znamienności statystycznej. We wszystkich badanych grupach KKCz od 14 dnia przechowywania stężenie 2,3-DPG utrzymywało się na stałym poziomie (0,7–0,1 μ mol/ml) z wyjątkiem składników napromieniowanych dawką 50 Gy i przechowywanych 42 dni, gdzie stężenie to wynosiło zaledwie 0,04 μ mol/ml, co stanowi 2% początkowej wartości.

Dyskusja

Współczesne krwiodawstwo i krwiolecznictwo wykorzystuje zdobycze nowoczesnych technologii po to, by wytwarzane składniki krwi były jak najbezpieczniejsze dla biorcy oraz skuteczne klinicznie. Podstawowe składniki krwi otrzymywane w centrach krwiodawstwa i krwiolecznictwa poddawane są takim procedurom, jak płukanie, filtrowanie, rekonstruowanie w osoczu oraz napromienianie. Szczególnie komórkowe składniki krwi, jak

KKCz czy KKP, przygotowywane dla pacjentów z upośledzonym układem odpornościowym (nabytym lub wrodzonym), oprócz filtrowania w celu zubożenia w leukocyty, muszą być także poddawane działaniu promieniowania jonizującego γ . Postępowanie to ma zapobiec wystąpieniu groźnego powikłania TA-GvHD, które mogą spowodować immunokompetentne limfocyty T występujące w komórkowych składnikach krwi.

Najlepsze efekty kliniczne osiąga się po zastosowaniu świeżo wyizolowanych koncentratów krwinek czerwonych. Nie zawsze jednak jest to możliwe, dlatego wprowadzenie do użytku zestawów z płynami wzbogacającymi (np. ADSOL lub SAGM) spowodowało przedłużenie czasu przechowywania KKCz do 42 dni.

Utrzymanie w stanie nienaruszonym struktury krwinek czerwonych jest uzależnione od prawidłowego wewnątrzkomórkowego przebiegu procesów przemiany materii. W czasie przechowywania KKCz dochodzi do wyczerpania układów enzymatycznych oraz do naturalnych ubytków różnych związków chemicznych biorących udział w tej przemianie. Z upływem czasu obserwuje się zachwianie równowagi między wnętrzem komórki a środowiskiem zewnętrznym wskutek nagromadzenia się uwolnionych w toku przemian produktów ubocznych. Powoduje to zaburzenie prawidłowego przebiegu procesów metabolicznych, a w końcowym efekcie prowadzi do uszkodzenia struktury komórkowej. Zastosowanie promieniowania jonizującego γ dodatkowo nasila powstające zmiany poprzez bezpośredni lub pośredni wpływ przede wszystkim na przemiany metaboliczne i uszkodzenie jądra komórki. Ponieważ krwinki czerwone nie posiadają jądra, wydaje się, że promieniowanie działa bezpośrednio na błonę komórkową [11, 15].

Wśród badaczy zajmujących się wpływem promieniowania γ na komórkowe składniki krwi nie ma jednomyślności, jaką dawkę promieniowania należy stosować. Według dyrektywy Unii Europejskiej wszystkie składniki krwi przeznaczone dla pacjentów z upośledzonym układem odpornościowym lub do transfuzji wymiennych i dopłodowych powinny być napromieniane dawkami 25–50 Gy.

Przeprowadzając ocenę *in vitro* KKCz napromienianych różnymi dawkami promieniowania γ , wybrano najczęściej obecnie stosowane metody, których parametry określają własności funkcjonalne krwinek czerwonych. Badania przeprowadzane podczas 42 dni przechowywania dostarczyły dodatkowych informacji o bardziej odległych skutkach promieniowania jonizującego.

Najczęściej stosowaną rutynowo dawką promieniowania γ jest 25 Gy, albowiem po jej zastosowaniu

istnieje 90-procentowe prawdopodobieństwo, że żadna spośród populacji immunokompetentnych komórek nie przeżyje napromieniowywania. Ponieważ brakuje dokładnych opracowań analizujących wpływ większych dawek promieniowania γ na KKCz, postanowiono zbadać także wpływ dawki 50 Gy. Jak opisano w literaturze, dawki rzędu 50 Gy osłabiają odpowiedź limfocytów na stymulację mitogenami aż o 98,5% [16].

Najważniejszymi parametrami charakteryzującymi jakość KKCz są: stężenie ATP, stężenie 2,3-DPG, stężenie K^+ oraz stężenie wolnej Hb. Krwinki czerwone potrzebują energii zmagazynowanej w ATP do utrzymania kształtu, fosforylacji białek i fosfolipidów, aktywnego transportu przez błonę, częściowej syntezy nukleotydów purynowych i pirymidynowych oraz syntezy glutationu. Dla krwinek czerwonych głównym substratem dostarczającym ATP jest glukoza, stanowiąca składnik roztworów wzbogacających (SAGM, ADSOL), umożliwiających przechowywanie KKCz do 42 dni [14]. Glikoliza to główne źródło energii dla pozbawionej mitochondriów dojrzałej krwinki czerwonej. Wydajność energetyczna rozkładu glukozy na drodze glikolizy mierzona liczbą cząsteczek ATP wytworzonych na jedną cząsteczkę zmetabolizowanej glukozy wynosi 2 cząsteczki ATP. Udowodniono, że istnieje korelacja pomiędzy zawartością ATP w KKCz *in vitro* a ich odzyskaniem w krążeniu biorcy. Składniki krwi o niskiej zawartości ATP są szybciej usuwane z krążenia biorcy. Leitner i wsp. stosowali promieniowanie jonizujące w dawce 30 Gy i wykazali około 25-procentowy spadek stężenia ATP w 14 dniu przechowywania w stosunku do KKCz nienapromienianego [17].

Wytwarzanie 2,3-DPG jest także związane z glikolizą i stanowi ważny czynnik regulujący zdolność Hb do przenoszenia tlenu. Szlak bifosfoglicerynianowy umożliwia wytworzenie w krwince czerwonej znaczących ilości 2,3-DPG, który wiąże się z Hb i wywiera duży wpływ na jej powinowactwo do tlenu. Na stężenie 2,3-DPG ma wpływ pH, ponieważ krwinki czerwone metabolizują glukozę do mleczanu, nagromadzeniu ulegają jony wodorowe, obniża się pH osocza i maleje ilość 2,3-DPG. Uwalnianie tlenu w tkankach jest wprost proporcjonalne do stężenia 2,3-DPG w krwinkach. Dlatego w przypadku masowych transfuzji powinno się podawać świeżą krew [18]. W badaniach autorów niniejszej pracy stwierdzono znaczny spadek 2,3-DPG już w 2 tygodniu przechowywania KKCz.

Oceniając stężenie 2,3-DPG w KKCz napromienianych dawkami 25 i 50 Gy, stwierdzono istotne zmiany wartości tego parametru zarówno w grupie kontrolnej (0 Gy), w której stężenie w koń-

cowym okresie przechowywania obniżyło się o 94% w stosunku do wartości wyjściowej, jak i w grupach badanych: 96% dla dawki 25 Gy oraz 98% po zastosowaniu dawki 50 Gy. Podobne wyniki uzyskali Davey i wsp., stosując dawkę 30 Gy. W tym przypadku obniżenie stężenia 2,3-DPG w 42. dniu przechowywania wynosiło 89%, podczas gdy w grupie nienapromienianych KKCz — 91%.

Błona krwinki czerwonej utrzymuje równowagę osmotyczną i jonową komórki. Transport jonów i składników organicznych przez błonę może być czynny lub bierny. Potas gromadzi się w krwince czerwonej w wyniku aktywnego transportu. Jego stężenie w komórce jest około 27 razy większe niż w środowisku zewnętrznym. Straty energii w czasie przechowywania i uszkodzenia wywołane napromienianiem powodują osłabienie czynnego transportu i przechodzenie w procesie dyfuzji K^+ na zewnątrz komórki. Szybkość tego procesu zależy od składu płynu konserwującego. Błona komórkowa przepuszcza Na^+ w obu kierunkach, ale przenikanie Na^+ z osocza do wnętrza komórki jest powolne. Rivet i wsp. [22], podobnie jak większość autorów innych doniesień, stwierdzili znamienne statystycznie różnice w KKCz napromienianych dawką 30 Gy już w 4 dniu przechowywania. W wypadku użycia takich jednostek do przetoczeń dla noworodków zaleca się odpłukiwanie osocza [18–23]. Stężenie K^+ we wszystkich badanych grupach w badaniach prowadzonych przez autorów prezentowanej pracy nie było tak wysokie, jak sygnalizują inni autorzy. Ramirez i wsp. zastosowali dawkę 40 Gy, a stężenie K^+ w 14 dniu przechowywania było 30-krotnie wyższe w stosunku do dnia zerowego. Dla porównania, w grupie kontrolnej stężenie K^+ było 14 razy wyższe. Ze względu na wysokie stężenie potasu Ramirez i wsp. stwierdzili, że KKCz do transfuzji dopłodowych i dla wcześniaków powinny być świeże i napromieniane przed przetoczeniem [24].

W przeprowadzonych badaniach w przypadku KKCz napromienianych dawką 50 Gy stężenie K^+ 7. dnia przechowywania okazało się prawie 2-krotnie wyższe w porównaniu z jego stężeniem w KKCz, które nie były poddane promieniowaniu γ i przechowywane też przez 7 dni.

Prawdopodobnie w wyniku uszkodzenia błony komórkowej dochodzi nie tylko do znacznego wpływu K^+ do osocza, ale zwiększa się także zawartość Hb w osoczu. Po zastosowaniu dawki 50 Gy zaobserwowano najwyższą wartość wolnej Hb 42 dnia przechowywania. Znamienne statystycznie różnice w stężeniu Hb w KKCz, zarówno w grupie kontrolnej, jak i w grupach badanych składników krwi, pokrywają się z doniesieniami innych autorów [25].

Porównując podstawowe parametry biochemiczne, jak stężenie ATP, 2,3-DPG, Hb, K^+ , w KKCz napromienianych (25 Gy i 50 Gy) oraz tych, które nie były poddane działaniu promieniowania γ , można stwierdzić, że KKCz napromieniane dawką 50 Gy nie powinny być przechowywane w temperaturze 4°C dłużej niż 14 dni nawet przy zastosowaniu roztworu wzbogacającego ADSOL. Koncentraty krwinek czerwonych napromienowane dawką 25 Gy mogą być przechowywane i przetaczane do 28 dni. Na podstawie przeprowadzonych badań *in vitro* można przypuszczać, że napromienowane krwinki czerwone będą spełniać swoje funkcje w organizmie biorcy.

Wartość biologiczną KKCz można oceniać przedstawionymi powyżej metodami pośrednimi *in vitro*. Wielu autorów uważa, że takie parametry, jak stężenie ATP czy 2,3-DPG, są wykładnikami funkcji krwinek czerwonych *in vivo*. Jednak najbardziej miarodajną metodą, oceniającą skuteczność przetoczeń KKCz jest ocena stanu klinicznego pacjenta oraz wykonanie oznaczeń: stężenia Hb, liczby krwinek czerwonych oraz czasu przeżycia ich w krążeniu biorcy.

Piśmiennictwo

1. Davey R.J., McCoy N.C., Sullivan J.A. i wsp. The effect of prestorage irradiation on posttransfusion red cell survival. *Transfusion* 1992; 32: 525–528.
2. Linden J.V., Pisciotto P.T. Transfusion-associated graft-versus-host disease and blood irradiation. *Transf. Med. Rev.* 1992; 6: 116–123.
3. Heaton A. Blood component irradiation and prevention of graft-versus-host disease. *Transf. Sci.* 1995; 16: 121–123.
4. Moroff G., Luban N.L.C. The irradiation of blood and blood components to prevent graft-versus-host disease: technical issues and guidelines. *Transf. Med. Rev.*, 1997; 11: 15–26.
5. Roberts G.T., Sacher R.A. Transfusion-associated graft-versus-host disease. w: Rossi E.C., Simon T.L., Moss G.S., Gould S.A. *Principles of transfusion medicine*. Williams and Wilkins 1996; 375–382.
6. Dwyre D.M., Holland P.V. Transfusion-associated graft-versus-host disease. *Vox Sanguinis* 2008; 95: 85–93.
7. Leitman S.F.: Dose, dosimetry, and quality improvement of irradiated blood components. *Transfusion* 1993; 33: 447–449.
8. Suzuki K., Akiyama H., Takamoto S. i wsp. Transfusion-associated graft-versus-host disease in a presumably immunocompetent patient after transfusion of stored packed red cells. *Transfusion* 1992; 32: 358–360.
9. Akahoshi M., Takanashi M., Masuda M. i wsp. A case of transfusion-associated graft-versus-host disease not prevented by white cell-reduction filters. *Transfusion* 1992; 32: 169–172.
10. Ohto H., Anderson K.C. Posttransfusion graft-versus-host disease in Japanese newborns. *Transfusion* 1996; 36: 117–123.
11. Williamson L.M. UK guidelines for the irradiation of blood components. *Transfus. Sci.* 1995; 16, 2, 135–137.
12. Voak D. Guidelines on γ irradiation of blood components for the prevention of transfusion-associated graft-versus-host disease. *Transf. Med.* 1996; 6: 261–271.

13. Warwick R.M., Seghatchian M.J., Penny S. Clinical and laboratory aspects of TA-GvHD with reference to perinatal patients and γ -irradiated red cell components. *Transf. Sci.* 1995; 16 (2): 115–119.
14. Łętowska M. Medyczne zasady pobierania krwi, oddzielania jej składników i wydawania, obowiązujące w jednostkach organizacyjnych publicznej służby krwi. Instytut Hematologii i Transfuzjologii, Warszawa 2006.
15. Weiskopf R.B., Schnapp S., Rouine-Rapp K. i wsp. Extracellular potassium concentration in red blood cell suspensions after irradiation and washing. *Transfusion* 2005; 45: 1295–1301.
16. Lachert E. Potransfuzyjna choroba przeszczep przeciwko gospodarzowi. *Błok Operacyjny* 2000; 3: 57–62.
17. Leitner G.C., Neuhauser M., Weigel G., Kurze S., Fischer M.B., Höcker P. Altered intracellular purine nucleotides in γ -irradiated red blood cell concentrates. *Vox Sanguinis* 2001; 81: 113–118.
18. Kurup P.A., Arun P., Gayathri N.S. i wsp. Modified formulation of CPDA for storage of whole blood, and of SAGM for storage of red blood cells, to maintain the concentration of 2,3-diphosphoglycerate. *Vox Sanguinis* 2003; 85: 253–261.
19. Cid J., Ramiro L., Bertran S. i wsp. Efficacy in reducing potassium load in irradiated red cell bags with a potassium adsorption filter. *Transfusion* 2008; 48: 1966–1970.
20. DePalma L., Duncan B., Chan M.M., Luban N.L.C. The neonatal immune response to washed and irradiated red cells: lack of evidence of lymphocyte activation. *Transfusion* 1991; 31: 737–742.
21. Friedman K.D., Backstrom C., Armon M. Newborn tolerance of the potassium (K^+) load from simple transfusion (ST) of stored irradiated blood cells (RBCs). *Transfusions* 1992; 32 (supl.).
22. Rivet C., Baxter A., Rock G. Potassium levels in irradiated blood. *Transfusion* 1989; 29: 185.
23. Swann I.D., Williamson L.M. Potassium loss from leucodepleted red cells following γ irradiation. *Vox Sanguinis* 1996; 70: 117–118.
24. Ramirez A.M., Woodfield D.G., Scott R., McLachlan J. High potassium levels in stored irradiated blood. *Transfusion* 1987; 27: 444–445.
25. Janatpour K., Denning L., Nelson K. i wsp. Comparison of X-ray vs. γ irradiation of CPDA-1 red cells. *Vox Sanguinis* 2005; 89: 215–219.